

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



②① Aktenzeichen: P 33 17 415.6  
②② Anmeldetag: 13. 5. 83  
②③ Offenlegungstag: 15. 11. 84

*Corresp to US 4 764 473*

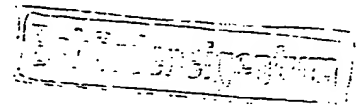
DE 33 17 415 A 1

⑦① Anmelder:

Kernforschungsanlage Jülich GmbH, 5170 Jülich, DE

⑦② Erfinder:

Matschke, Christian, 5110 Alsdorf, DE; Arnold,  
William Michael, 5100 Aachen, DE; Büchner,  
Karl-Heinz, 5170 Jülich, DE; Zimmermann, Ulrich,  
Prof., 8700 Würzburg, DE



Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Kammer zur Behandlung von Zellen im elektrischen Feld

Die Erfindung bezieht sich auf eine Kammer für die Behandlung von Zellen im elektrischen Feld, bei der ein aus elektrisch nichtleitenden Wänden gebildeter Raum zur Aufnahme der die Zellen enthaltenden Suspension vorgesehen ist. In den Raum ragen wenigstens zwei Elektroden derart hinein, daß ein zwischen den Elektroden liegender Bereich gebildet wird, in welchem die Zellen einem zwischen den Elektroden ausgebildeten elektrischen Feld ausgesetzt sind. Erfindungsgemäß ist der zur Aufnahme der die Zellen enthaltenden Suspension vorgesehene Raum von einem Innenkörper und einer den Innenkörper um dessen Längsachse mit gleichbleibendem Abstand umschließenden Außenhülle seitlich begrenzt. In den so gebildeten Raum ragen Elektroden hinein, die den Innenkörper in Form einer mehrgängigen Schraube mit gleichbleibender Steigung derart umgeben, daß der durch die Elektroden begrenzte Bereich als ein in Form einer mehrgängigen Schraube den Innenkörper umgebende Teilbereich des Raumes ausgebildet ist. In einer besonderen Ausführungsform ist die Kammer in der Art eines Reagenzglases mit Innenkörper ausgebildet, an dessen unterem Ende ein Zusatzgefäß zur Aufnahme der elektrisch behandelten Zellen vorgesehen ist.

DE 33 17 415 A 1

## P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Kammer für die Behandlung von Zellen im elektrischen Feld, bei der ein aus elektrisch nicht leitenden Wänden gebildeter Raum zur Aufnahme der die Zellen enthaltenden Suspension vorgesehen ist, 5 in den wenigstens zwei Elektroden derart hineinragen, daß ein zwischen den Elektroden liegender, durch diese begrenzter Bereich gebildet wird, in welchem die Zellen einem zwischen den Elektroden ausgebildeten elektrischen Feld ausgesetzt sind, d a d u r c h g e k e n n z e i c h - 10 n e t , daß der Raum (1) von einem Innenkörper (2) und einer den Innenkörper um dessen Längsachse mit gleichbleibendem Abstand umschließenden Außenhülle (3) seitlich begrenzt ist und daß 15 die in den Raum hineinragenden Elektroden (4 und 5) den Innenkörper in Form einer mehrgängigen Schraube mit gleichbleibender Steigung derart umgeben, daß der durch die Elektroden begrenzte Bereich als ein in Form einer mehrgängigen Schraube 20 den Innenkörper um dessen Längsachse umgebender Teilbereich (6a, 6b) des Raumes (1) ausgebildet ist.
2. Kammer nach Anspruch 1, d a d u r c h g e - 25 k e n n z e i c h n e t , daß jede Elektrode (4 und 5) nach beiden Seiten zur nächstliegenden anderen Elektrode den gleichen Abstand hat.
3. Kammer nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h 30 g e k e n n z e i c h n e t , daß der Innenkörper

T 1.676

- 2 -

per (2) zylinderförmig und die Außenhülle (3) als zylinderförmiger Mantel mit gemeinsamer Mittelachse ausgebildet sind.

- 5     4. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
da durch gekennzeichnet,  
daß die Elektroden (4, 5) an dem Innenkörper (2)  
anliegen.
- 10    5. Kammer nach Anspruch 4, da durch gekennzeichnet,  
daß die Elektroden-  
anschlüsse (4a, 4b, 5a, 5b) durch den Innenkörper  
(2) nach außen geführt sind.
- 15    6. Kammer nach einem der Ansprüche 1 bis 4, da durch  
gekennzeichnet, daß die Elektroden  
(4, 5) an der Innenwand der Außenhülle (3) anliegen.
- 20    7. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
da durch gekennzeichnet,  
daß der Abstand zwischen den Elektroden (4, 5)  
und der den Elektroden gegenüberliegenden Wandung  
so bemessen ist, daß die suspendierten Zellen  
und, im Falle einer Fusion von Zellen, die Fusions-  
25    produkte den Durchgang zwischen Elektroden (4, 5)  
und der Wandung gerade ohne Schädigung passieren  
können.
- 30    8. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
da durch gekennzeichnet,  
daß der Abstand zwischen den Elektroden (4 und 5)  
je nach der Art und Größe der zu behandelnden  
Zellen 20 µm bis 500 µm beträgt.

- 3 -

- 3 -

9. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Elektroden (4, 5) bei größerem Elektroden-  
abstand einen kreisförmigen Querschnitt aufweisen.
- 5 10. Kammer nach Anspruch 9, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß die Elektroden (4, 5)  
zu etwa einem Drittel ihres Durchmessers in  
ihrer Auflage versenkt angeordnet sind.
- 10 11. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß bei einer Elektrodenlänge von mehr als 1 m  
die Elektroden (4, 5) jeweils als elektrische  
15 Schleife ausgebildet und jedes Ende der Elektro-  
den (4, 5) mit einem Elektrodenanschluß (4a,  
4b, 5a, 5b) in Verbindung steht.
- 20 12. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Außenhülle (3) aus durchsichtigem Material  
besteht und an wenigstens einer Stelle ihres  
Außenmantels eben ausgebildet ist.
- 25 13. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß durch den Innenkörper (2) eine Kühlleitung  
(14) geführt ist.
- 30 14. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Innenkörper (2) ein zum Raum (1) der

- 4 -

- 4 -

- 5 Kammer hin geöffnetes, von außen über eine Leitung zugängliches Porensystem aufweist, über welches eine Flüssigkeit in den Raum (1) gedrückt werden kann, wobei die dem Raum zugewendeten Öffnungen der Poren kleiner sind als der Durchmesser der zu behandelnden Zellen.
- 10 15. Kammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Außenhülle (3) an einer Stirnseite geschlossen ausgeführt ist, der Innenkörper (2) stabförmig und an die innere Form der Außenhülle (3) angepaßt ausgebildet ist und daß ein Verschluß (10) zum Verschließen des Raumes (1) an der
- 15 offenen Stirnseite der Außenhülle (3) vorgesehen ist.
- 20 16. Kammer nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die geschlossene Stirnseite der Außenhülle (3) eine Öffnung (9) aufweist.
- 25 17. Kammer nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Öffnung (9) verschließbar ist.
- 30 18. Kammer nach einem der Ansprüche 16 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein an die Außenhülle (3) lösbar anschließbares, mit der Öffnung (9) in der Außenhülle in Verbindung stehendes Zusatzgefäß (11) vorgesehen ist.

- 5 -

13.05.83

3317415

- 5 -

19. Kammer nach Anspruch 18, d a d u r c h g e -  
k e n n z e i c h n e t , daß die über die Öffnung (9)  
in der Stirnseite der Außenhülle (3) führende  
Verbindung zwischen dem Raum (1) der Kammer  
5 und dem Innenraum des Zusatzgefäßes (11) unter-  
brechbar ist.
20. Kammer nach Anspruch 19, d a d u r c h g e -  
k e n n z e i c h n e t , daß zur Unterbrechung  
10 der über die Öffnung (9) führenden Verbindung  
zwischen dem Raum (1) der Kammer und dem Innen-  
raum des Zusatzgefäßes (11) die Öffnung des  
Zusatzgefäßes mit einer Folie (12) abgedeckt  
ist.
21. Kammer nach Anspruch 20, d a d u r c h g e -  
k e n n z e i c h n e t , daß eine von außerhalb  
der Kammer betätigbare Einrichtung (13) vorgesehen  
ist, mittels der die Folie (12) bei an der Außen-  
15 hülle (3) befestigtem Zusatzgefäß (11) durch-  
löchert werden kann.
- 20



Kammer zur Behandlung von Zellen im elektrischen Feld

Die Erfindung bezieht sich auf eine Kammer für die Behandlung von Zellen im elektrischen Feld, bei der ein aus elektrisch nichtleitenden Wänden gebildeter Raum zur Aufnahme der die Zellen  
5 enthaltenden Suspension vorgesehen ist, in den wenigstens zwei Elektroden derart hineinragen, daß ein zwischen den Elektroden liegender, durch diese begrenzter Bereich gebildet wird, in welchem die Zellen einem zwischen den Elektroden ausge-  
10 bildeten elektrischen Feld ausgesetzt sind.

Aus der DE-PS 24 05 119 ist ein Verfahren zur Behandlung von Zellen im elektrischen Feld bekannt, bei dem die Membran von Zellen durch Anwendung  
15 eines elektrischen Feldes, dessen Stärke  $10^3$  bis  $10^5$  V/cm beträgt, durchbrochen wird. Die dabei bewirkte Permeabilitätserhöhung der Zellmembran macht es möglich, Stoffe durch die Membran auszutauschen, ohne daß die Zellen in ihrer  
20 Lebensfähigkeit beeinträchtigt sind. Denn die Erhöhung der Permeabilität ist nach dem Austausch der Stoffe in einem einfachen Verfahrensschritt reversibel. Auf diese Weise ist es beispielsweise auch möglich, Gene oder Enzyme in die Zellen  
25 einzulagern.

l.676

ba/ha

7  
- 7 -

Das aus der vorgenannten Patentschrift bekannte Verfahren der Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran ist auch zur Fusion von Zellen einsetzbar.

5

Zwei Zellen in einer Suspension sollten, wenn sie sich berühren und ein enger Kontakt zwischen den Membranen beider Zellen entsteht, miteinander verschmelzen, da die Bausteine in der  
10 Membran beweglich sind. Eine derartige spontane Verschmelzung (Fusion) von Zellen wird unter natürlichen Bedingungen jedoch nicht oder nur äußerst selten beobachtet. Eine bekannte Ausnahme stellt die Befruchtung einer Eizelle  
15 durch eine Samenzelle bei der sexuellen Fortpflanzung dar. Die spontane Fusion wird durch die negative Ladung der Phospholipide und anderer Membrankomponenten behindert. Sie führt zur Abstoßung der Zellen, wenn sie sich auf  
20 einen geringen Abstand genähert haben. Zellverschmelzung erfordert aber, daß die beiden Membranen sich bis auf einen Abstand von weniger als  $10^{-7}$  cm nähern können.

25 Die mit technischen Mitteln, also auf künstlichem Wege durchgeführte Fusion von Zellen ist in einem weiten Anwendungsbereich einsetzbar. So ist es für die biologisch-medizinische Forschung von großem Interesse, eine große Zahl  
30 von Zellen miteinander zu verschmelzen. Bei geeigneter Größe der durch Fusion mehrerer oder gegebenenfalls vieler Zellen - beispielsweise 1000 bis 10000 Blutkörperchen -

entstandenen großen Zellen lassen sich dann  
Mikroelektroden, Mikrodruckmeßsonden und andere  
Sensoren ohne irreversible Zerstörung der Membran  
in die große Zelle einführen. Die Technik, über  
5 die Sensoren direkt eine Reihe von Zellen und  
Membranfunktionen zu erfassen, ist dabei für  
die klinische Diagnostik, z.B. bei der Früher-  
kennung von Erkrankungen sowie generell für  
die Grundlagenforschung von Bedeutung.

10

Die Technik der Fusion von Zellen kann außerdem  
eingesetzt werden für die Bildung von Hybridzellen  
durch Verschmelzung von zwei Zellen unterschiedlicher  
Herkunft, die evolutionsmäßig nicht zu weit  
15 voneinander entfernt stehen sollen. Dabei können  
Zellhybride aus Pflanzenzellen, aus denen wieder  
ganze Pflanzen gezüchtet werden können oder  
Zellhybride aus tierischen Zellen, über die  
monoklonale Antikörper, z.B. gegen Tumore und  
20 Leukämie, gewonnen werden können, gebildet werden.  
Als Beispiel sei genannt die Verschmelzung einer  
Lymphozytenzelle mit einer Myelomzelle, die  
besonders aus medizinischer und pharmazeutischer  
Sicht von großem Interesse ist. Bestimmte Lympho-  
25 zyten bilden gegen Fremdstoffe im Organismus  
Antikörper, z.B. gegen ein Fremdeiweiß, das  
in die Blutbahn injiziert worden ist. Isoliert  
man die Lymphozyten und fusioniert sie mit einer  
Tumorzelle, wie der Myelomzelle, so besteht  
30 die Chance, daß sich eine sogenannte Hybridomzelle

- bildet, die die Eigenschaft beider Elternzellen besitzt. Diese Zelle produziert Antikörper, und zwar spezifisch nur gegen den betreffenden Fremdstoff (sogenannte monoklonale Antikörper).
- 5 Sie ist unsterblich und läßt sich im Gegensatz zu einer normalen ausdifferenzierten Zelle, wie dem Lymphozyten, permanent in Nährmedien vermehren.
- 10 Ein Verfahren zur Fusion von Zellen der eingangs bezeichneten Art ist aus Biochimica et Biophysica Acta, 694 (1982), 227 - 277 (Electric Field-Mediated Fusion And Related Electrical Phenomena, U. Zimmermann) bekannt. Bei diesem bekannten Verfahren
- 15 - dessen Ablauf unter dem Mikroskop beobachtet werden kann - wird der Membrankontakt zwischen wenigstens zwei Zellen durch Anlegen eines alternierenden, schwach homogenen Feldes erzeugt. Durch das elektrische Feld werden, bedingt durch
- 20 Polarisationsprozesse in der Zelle, Dipole erzeugt, die sich gegenseitig anziehen, wenn sich die Zellen während ihrer Wanderung im elektrischen Feld einander nähern (sogenannte Dielektrophorese). Nach der Bildung der Zellenreihe werden die
- 25 Störungen in der Membranstruktur zwischen benachbarten Zellen durch einen elektrischen Durchbruchpuls ausgelöst (J. Membrane Biol. 67, 165 - 182 (1982), Electric Field-Induced Cell-to-Cell Fusion, U. Zimmermann and J. Vienken).
- 30 Dabei werden - nach den bisherigen Modellvor-

stellungen - Löcher in der Membrankontaktzone  
benachbarter Zellen erzeugt, die zu einem zytoplas-  
matischen Kontinuum zwischen den beiden Zellen  
und zur Brückenbildung von Lipiden zwischen  
5 den Membranen der benachbarten Zellen führen.  
Die Lipidmoleküle ordnen sich nicht mehr in  
ihre ursprüngliche Membran ein. Sobald sich  
eine Brücke gebildet hat, kommt es aus energetischen  
Gründen zur Abrundung des entstandenen Gebildes,  
10 das aus den über die Lipidbrücken miteinander  
verbundenen Zellen besteht.

Zur Durchführung dieser bekannten Verfahren  
wird eine Kammer der eingangs bezeichneten Art  
15 eingesetzt. Die Elektroden der Kammer sind dabei  
zur Bildung der Zellenreihe an eine Einrichtung  
zur Erzeugung eines alternierenden elektrischen  
Feldes und zur Erzeugung des elektrischen Durch-  
bruches an eine Einrichtung zur Erzeugung elek-  
20 trischer Spannungspulse angeschlossen.

Bei der Durchführung der bekannten Verfahren  
ist man bestrebt, zur Erhöhung der Effektivität  
der Verfahren die in einer Suspension vorliegenden  
25 Zellen möglichst alle der elektrischen Behandlung  
zu unterwerfen. Dies setzt voraus, daß die in  
die Kammer eingegebenen Zellen möglichst alle  
dem elektrischen Feld ausgesetzt werden. Die  
toten Zonen in der Kammer sollten daher möglichst  
30 klein sein.

1A  
- 8 -

- Es ist Aufgabe der Erfindung, eine Kammer der eingangs bezeichneten Art zu schaffen, bei der ein hoher Anteil der in die Kammer eingegebenen Zellen dem elektrischen Feld ausgesetzt wird.
- 5 Die Kammer soll außerdem die gleichzeitige und gleichmäßige Behandlung einer großen Anzahl von Zellen ermöglichen.

- Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird gemäß der Erfindung dadurch gelöst, daß der
- 10 Raum zur Aufnahme der die Zellen enthaltenden Suspension von einem Innenkörper und eine den Innenkörper um dessen Längsachse mit gleichbleibendem Abstand umschließenden Außenhülle seitlich begrenzt
- 15 ist und daß die in den Raum hineinragenden Elektroden den Innenkörper in Form einer mehrgängigen Schraube mit gleichbleibender Steigung derart umgeben, daß der durch die Elektroden begrenzte Bereich als ein in Form einer mehrgängigen Schraube
- 20 den Innenkörper um dessen Längsachse umgebender Teilbereich des Raumes ausgebildet ist.

- Die Elektroden und der begrenzte Bereich sind beispielsweise in der Form einer Doppelhelix,
- 25 einer Vierfach-Helix usw. ausgebildet.

- Eine sehr vorteilhafte Ausführungsform der Kammer besteht darin, daß jede Elektrode nach beiden
- 30 Seiten zur nächstliegenden anderen Elektrode den gleichen Abstand hat. Damit wird erreicht, daß der Feldverlauf zwischen zwei benachbarten Elektroden gleich ist, womit die effektive Länge der Elektroden praktisch verdoppelt ist.

Der längliche Innenkörper ist zweckmäßigerweise zylinderförmig und die Außenhülle als zylinderförmiger Mantel mit gemeinsamer Mittelachse ausgebildet. Der längliche Innenkörper kann jedoch auch abweichend von der idealen Kreisform beispielsweise einen ovalen oder auch quadratischen Querschnitt aufweisen, an den jeweils die innere Form der Außenhülle angepaßt ist.

10 Eine zweckmäßige Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung besteht darin, daß die Elektroden an dem Innenkörper anliegen. Dabei ist es ferner zweckmäßig, die Elektrodenanschlüsse durch den Innenkörper nach außen zu führen.

15 Bei einer weiteren Ausführungsform der Kammer liegen die Elektroden an der Innenwand der Außenhülle an.

20 Bei allen Ausführungsformen der Kammer gemäß  
der Erfindung ist die innere Form der Außenhülle  
in einem möglichst geringen Abstand von 20  $\mu\text{m}$   
bis 500  $\mu\text{m}$  - im allgemeinen jedoch nicht geringer  
als 100  $\mu\text{m}$  - an die Form des Innenkörpers angepaßt,  
25 so daß das tote Volumen, also das Volumen, in  
welchem Zellen nicht dem elektrischen Feld aus-  
gesetzt sind, möglichst klein ist. Dabei ist  
es zweckmäßig, daß der Abstand zwischen den  
Elektroden und der den Elektroden gegenüberliegenden  
30 Wandung - also beispielsweise bei am Innenkörper  
anliegenden Elektroden die Innenwandung der  
Außenhülle - so bemessen ist, daß die suspendierten

Zellen und, im Falle einer Fusion von Zellen, die Fusionsprodukte den Durchgang zwischen Elektroden und Wandung gerade ohne Schädigung passieren können.

5

Bei Verwendung von Einrichtungen zur Erzeugung eines elektrischen Wechselfeldes (für die Bildung der Zellenreihe) mit einer Ausgangsspannung von 50 V<sub>p-p</sub> an 50  $\Omega$  und einer Einrichtung zur Erzeugung eines Rechteckpulses (für den elektrischen Durchbruch) von 100 V an 50  $\Omega$  beträgt der Abstand der Elektroden zueinander je nach der Art und Größe der zu behandelnden Zellen im allgemeinen 20  $\mu$ m bis 500  $\mu$ m. Er wird für Hefe und Bakterienzellen etwa zwischen 50  $\mu$ m und 100  $\mu$ m, für tierische Zellen etwa zwischen 100  $\mu$ m und 200  $\mu$ m und für pflanzliche Zellen etwa zwischen 100  $\mu$ m und 500  $\mu$ m liegen. Die Steigung der mehrgängigen Schraube ergibt sich dabei aus dem gewählten Elektrodenstand. Bei Verwendung einer Einrichtung mit höherer Ausgangsspannung und entsprechend höherer Leistung kann der Elektrodenabstand selbstverständlich größer - beispielsweise 5 mm - sein.

25

Bei größerem Elektrodenabstand und damit auch bei größerem Elektrodenquerschnitt ist von Vorteil, wenn die Elektroden kreisförmigen Querschnitt aufweisen. Das ist beispielsweise dann der Fall, wenn die Elektroden aus einem auf den Innenkörper gewickelten Draht bestehen. Infolge des Kreisquerschnittes bildet sich zwischen den Elektroden

30



5 ein im Hinblick auf die Bildung einer Zellenreihe  
günstiges inhomogenes Feld aus. Dabei ist es  
zweckmäßig, daß die Elektroden zu etwa einem  
Drittel ihres Durchmessers in ihrer Auflage  
versenkt angeordnet sind. Auf diese Weise wird  
der Raum für die Zellsuspension möglichst  
klein gehalten.

10 Bei sehr geringen Elektrodenabständen, bei denen  
die Elektrodenschraube nicht aus Draht gewickelt  
werden kann, sondern andere Techniken zur Herstel-  
lung der Elektrodenschraube angewendet werden  
müssen, ergibt sich ein inhomogenes elektrisches  
Feld dann, wenn die Elektroden als flaches Band  
15 an dem Innenkörper oder der Innenwandung der  
Außenhülle anliegen.

20 Bei einer Elektrodenlänge von mehr als etwa  
1 m sind die Elektroden zweckmäßigerweise jeweils  
als elektrische Schleife ausgebildet, wobei  
jedes Ende der Elektroden mit einem Elektroden-  
anschluß in Verbindung steht. Zur Vermeidung  
von Reflektionen im Elektrodensystem werden  
zwei entsprechende - einer Seite der mehrgängigen  
25 Schraube zugeordnete - Anschlüsse der Elektroden  
über einen Widerstand miteinander verbunden,  
wobei der Widerstand auf den Wellenwiderstand  
abgeglichen ist. Die übrigen Anschlüsse der  
Elektroden sind dann mit der oder den Einrichtungen  
30 zur Erzeugung des elektrischen Feldes verbunden.

- Ein Abgleich des Widerstandes ist dabei beispielsweise - bei einer Außenhülle und einem Innenkörper aus Polymethacrylat und Platin als Elektrodenmaterial - bei einem Elektrodenabstand von 200  $\mu\text{m}$  und einer Frequenz der elektrischen Spannung von 1 MHz sowie einer Leitfähigkeit der Suspensionslösung von etwa 0,5 bis 1 mS dann nicht erforderlich, wenn die Elektroden eine Länge von 1,5 m nicht überschreiten.
- Um die Zellen während des Betriebes der Kammer unter dem Mikroskop beobachten zu können, ist es zweckmäßig, daß die Außenhülle der Kammer aus durchsichtigem Material, beispielsweise Polymethacrylat, besteht und an wenigstens einer Stelle ihres Außenmantels eben ausgebildet ist. Die Außenhülle kann dabei auch beispielsweise als Sechskant ausgebildet sein.
- Während des Betriebes der Kammer kann es infolge

16  
- 11 -

- des Stromflusses zu einer für die Zellen ungünstigen Erwärmung der die Zellen enthaltenden Suspension kommen. Dieser Erwärmung wird bei einer Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung, bei der durch den Innenkörper eine Kühlleitung geführt ist, entgegengewirkt. Eine Kühlleitung kann aber auch in der Außenhülle angeordnet sein.
- 10 Die Kammer gemäß der Erfindung kann als Durchflußkammer ausgestaltet sein, beispielsweise dadurch, daß sich an den Stirnseiten der Kammer die Zu- und Ableitungen befinden. Zum Betrieb der Kammer wird dann eine vorbestimmte Menge an Zellsuspensionslösung in die Kammer gedrückt oder gesaugt, die elektrische Behandlung vorgenommen, darauf die in der Kammer befindliche Suspensionslösung aus der Kammer gedrückt oder gesaugt und durch eine neue Menge an Zellsuspension ersetzt.
- 20 Zum Durchspülen des Kammerraumes mit einer Reinigungslösung nach der elektrischen Behandlung der Zellen kann es zweckmäßig sein, daß der Innenkörper ein zum Raum der Kammer hin geöffnetes, von außen über eine Leitung zugängliches Porensystem aufweist, über welches eine Flüssigkeit in den Raum gedrückt werden kann, wobei die dem Raum zugewendeten Öffnungen der Poren kleiner als der Durchmesser der zu behandelnden Zellen ist. Während des Betriebs der Kammer ist das Porensystem dann zweckmäßigerweise mit der gleichen Lösung, in welcher die Zellen suspendiert sind,
- 25
- 30

jedoch ohne Zellen, gefüllt.

Als besonders vorteilhaft hat sich jedoch eine Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung erwiesen, bei der die Außenhülle der Kammer an einer Stirnseite geschlossen ausgeführt ist, der Innenkörper stabförmig und an die innere Form der Außenhülle angepaßt ausgebildet ist und daß ein Verschuß zum Verschließen des Raumes an der offenen Stirnseite der Außenhülle vorgesehen ist. Durchqueren dabei die Elektrodenanschlüsse nicht den Raum der Kammer, sind die Elektrodenanschlüsse also bei an dem Innenkörper anliegenden Elektroden durch den Innenkörper nach außen geführt, dann kann eine Beladung der Kammer mit Zellsuspension dadurch vorgenommen werden, daß in die Außenhülle, welche zweckmäßigerweise die Form eines Reagenzglases hat, eine solche Menge an Zellsuspension eingegeben wird, die bei in die Außenhülle eingetauchtem Innenkörper den Kammerraum gerade ausfüllt und daß durch behutsames Eintauchen des stabförmigen Innenkörpers die die Zellen enthaltende Flüssigkeit über den ganzen Raum der Kammer verteilt wird.

Zweckmäßig kann es ferner sein, daß die geschlossene Stirnseite der Außenhülle eine Öffnung aufweist. Ist diese verschließbar, dann ist die Möglichkeit gegeben, zunächst wie mit der die Form eines Reagenzglases aufweisenden Außenhülle (die keine untere Öffnung aufweist) zu verfahren, nach der Durchführung der elektrischen Behandlung

jedoch die Zellsuspension durch die Öffnung abzusaugen.

5 Eine weitere vorteilhafte Ausführungsform der Kammer gemäß der Erfindung besteht darin, daß ein an die Außenhülle lösbar anschließbares, mit der Öffnung in der Außenhülle in Verbindung stehendes Zusatzgefäß vorgesehen ist.

10 Zweckmäßigerweise wird bei verschlossener Öffnung in der Außenhülle der Kammer zunächst die elektrische Behandlung der Zellen vorgenommen, sodann bei offener Öffnung das Zusatzgefäß an der Außenhülle befestigt und danach die Zellen durch  
15 Zentrifugieren - wobei die Kammer selbstverständlich von der oder den Einrichtungen zur Erzeugung des elektrischen Feldes abgetrennt ist - durch die Öffnung in das Zusatzgefäß gebracht. Das Zusatzgefäß kann dabei mit einer  
20 beliebigen, für die Weiterbehandlung der Zellen geeigneten Lösung, beispielsweise einem Nähr- oder einem Selektionsmedium, gefüllt sein.

Bei einer weiteren Ausführungsform der Kammer  
25 gemäß der Erfindung ist das Zusatzgefäß auch während der elektrischen Behandlung der Zellen an der Außenhülle der Kammer befestigt. Hierzu ist, wenn sich im Zusatzgefäß eine Lösung befindet, die während des Betriebs der Kammer nicht in  
30 den Raum der Kammer gelangen soll, die über die Öffnung in der Außenhülle führende Verbindung zwischen dem Raum der Kammer und dem Innenraum des Zusatzgefäßes zweckmäßigerweise unterbrechbar.

Das kann beispielsweise durch ein von außen betätigbares Absperrorgan für die Öffnung in der Stirnseite der Außenhülle geschehen.

- 5 Zur Unterbrechung der über die Öffnung in der Stirnseite der Außenhülle führenden Verbindung zwischen dem Raum der Kammer und dem Innenraum des Zusatzgefäßes kann die Öffnung des Zusatzgefäßes auch mit einer Folie abgedeckt sein.
- 10 Dabei ist, um die Zellen nach deren elektrischen Behandlung durch Zentrifugieren in das Zusatzgefäß zu bringen, eine von außerhalb der Kammer betätigbare Einrichtung vorgesehen, mittels der die Folie bei an der Außenhülle befestigtem
- 15 Zusatzgefäß durchlöchert werden kann.

- Eine solche Einrichtung kann darin bestehen, daß eine bewegbar im Innenkörper geführte Nadel vorgesehen ist, mittels der die Folie durchlöchert
- 20 werden kann. Eine solche Nadel kann jedoch auch im Zusatzgefäß, und zwar von unten betätigbar angebracht sein.

- Das Volumen des Innenraums des Zusatzgefäßes
- 25 wird zweckmäßigerweise so gewählt, daß für die nach der elektrischen Behandlung in das Zusatzgefäß abzentrifugierten Zellen die Zelldichte für das Wachstum hinreichend ist. Im allgemeinen wird das Volumen - das allerdings von der Größe
- 30 der Kammer abhängig ist - 500 µl bis etwa 2 ml betragen.

Ausführungsbeispiele der Kammer gemäß der Erfindung sind in der Zeichnung schematisch dargestellt

und werden im folgenden näher erläutert:

Es zeigen

- 5      Figur 1      einen Längsschnitt durch eine als  
Durchflußkammer ausgebildete Kammer  
mit am Innenkörper anliegenden Elektroden  
in Form einer Doppelhelix,
- 10      Figur 2      einen Längsschnitt durch eine als  
Durchflußkammer ausgebildete Kammer  
mit an der Innenwandung der Außenhülle  
anliegenden Elektroden in Form einer  
Doppelhelix,
- 15      Figur 3      Längsschnitt durch eine Kammer mit  
die Form eines Reagenzglases aufwei-  
sender Außenhülle und in die Außenhülle  
einschiebbarem Innenkörper,
- 20      Figur 4      Längsschnitt durch eine Kammer gemäß  
Figur 3 mit an die Außenhülle aufsteck-  
barem Zusatzgefäß und im Innenkörper  
bewegbar geführter Nadel zum Durchlöchern  
der Folie des Zusatzgefäßes,
- 25      Figur 5      Längsschnitt durch einen Innenkörper  
gemäß Figur 4 mit Kühlleitung,
- 30      Figur 6      Querschnitt durch den Innenkörper gemäß  
Figur 5 längs der Linie A-B.

Wie aus Figur 1 ersichtlich ist, wird der Raum 1  
der Kammer durch einen Innenkörper 2 und eine  
den Innenkörper um dessen Längsachse umschließen-  
de Außenhülle 3 seitlich begrenzt. Innenkörper 2  
ist - aus der Zeichnung allerdings nicht ersicht-  
lich - zylinderförmig und die Außenhülle 3 als  
zylinderförmiger Mantel ausgebildet. Beide Körper

bestehen aus Polymethacrylat oder einem anderen Kunststoff.

5 Wie aus Figur 1 ferner zu ersehen ist, umgeben  
die Elektroden 4 und 5, die aus einer Wicklung  
aus Platindraht bestehen, den Innenkörper 2.  
Die Elektroden haben auf ihrer ganzen Länge  
den gleichen Abstand zueinander. Sie sind jeweils  
als Schleife ausgebildet. Die vier Elektroden-  
10 anschlüsse 4a, 4b sowie 5a und 5b sind durch  
den Innenkörper 2 nach außen geführt. Die Anschlüsse  
4b und 5b können über einen in der Zeichnung  
nicht dargestellten, abzugleichenden Widerstand  
miteinander verbunden werden.

15 Der durch die Elektroden 4 und 5 begrenzte Bereich,  
in dem die Zellen dem elektrischen Feld ausgesetzt  
werden, umgibt den Innenkörper 2 als ein in  
der Form einer Doppelhelix ausgebildeter Teil-  
20 bereich 6a und 6b des Raumes 1.

Der Abstand der Elektroden 4 und 5 zu der Innen-  
wandung der Außenhülle 3 ist über die ganze  
Länge der Kammer konstant und liegt in dem in  
25 der Zeichnung dargestellten Beispiel etwa in  
dem Bereich von 100  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$ .

Die in Figur 1 dargestellte, als Durchflußkammer  
ausgebildete Kammer ist an den Stirnflächen  
30 geschlossen. Zur Zuführung der die Zellen enthal-  
tenden Lösung sind eine verschließbare Zuleitung 7  
und eine verschließbare Ableitung 8 vorgesehen.

Bei der in Figur 2 dargestellten, ebenfalls



als Durchflußkammer ausgebildeten Kammer liegen im Unterschied zu der in Figur 1 dargestellten Ausführungsform der Kammer die Elektroden 4 und 5 an der Innenwandung der Außenhülle 3 an.

5

Bei der in Figur 3 dargestellten Ausführungsform der Kammer ist die Außenhülle 3 an einer Stirnseite bis auf eine verschließbare Öffnung 9 verschlossen ausgeführt. Die Außenhülle 3 ist zylinderförmig und - bis auf die Öffnung 9 - in der Art eines Reagenzglases ausgebildet. Der Innenkörper 2 ist stabförmig und an die Innenform der Außenhülle 3 angepaßt ausgebildet. An ihm liegen die Elektroden 4 und 5 an, deren Anschlüsse 15 4a, 4b sowie 5a und 5b durch den Innenkörper nach außen geführt sind. Der durch die Elektroden begrenzte Bereich umgibt, wie bei der in Figur 1 dargestellten Ausführungsform der Kammer, den Innenkörper 2 als in der Form einer Doppelhelix ausgebildeter Teilbereich 6a und 6b des Raumes 1. 20

An der der offenen Stirnseite der Außenhülle 3 entsprechenden Stirnseite des Innenkörpers 2 ist ein Verschluß 10 für die Außenhülle 3 angebracht. 25

Die in Figur 4 dargestellte Ausführungsform der Kammer geht von der in Figur 3 dargestellten Ausführungsform aus, ist jedoch um das Zusatzgefäß 11 ergänzt. Die Außenhülle 3 ist bei der 30 in Figur 4 dargestellten Ausführungsform so ausgebildet, daß das Zusatzgefäß 11 aufsteckbar

ist. Die Öffnung 9 ist nicht verschlossen. Das Zusatzgefäß ist mit einer Folie 12 verschließbar. Es dient dann zur Aufnahme einer Flüssigkeit, beispielsweise eines Nährmediums, das während des Betriebs der Kammer nicht in den Raum 1 gelangen soll. Zum Durchlöchern der Folie nach dem Betrieb der Kammer und um die im Raum 1 befindlichen Zellen in das Zusatzgefäß abzentrifugieren zu können, ist eine durch den Innenkörper 2 geführte, bewegbare Nadel 13 vorgesehen.

In Figur 5 ist der Innenkörper 2 gemäß der in Figur 4 dargestellten Ausführungsform der Kammer wiedergegeben, jedoch mit einem zusätzlichen Kühlsystem, durch die ein Kühlmedium während des Betriebs der Kammer geleitet werden kann. Das Kühlsystem besteht aus der Zuleitung 14a, dem Hohlraum des Innenkörpers, in den die Zuleitung 14a hineinragt, und der Ableitung 14b.

Figur 6 zeigt einen Querschnitt durch den Innenkörper 2 der Figur 5 längs der Linie A-B.

Nummer:

33 17 415

Int. Cl.<sup>3</sup>:

C 12 N 13/00

Anmeldetag:

13. Mai 1983

Offenlegungstag:

15. November 1984

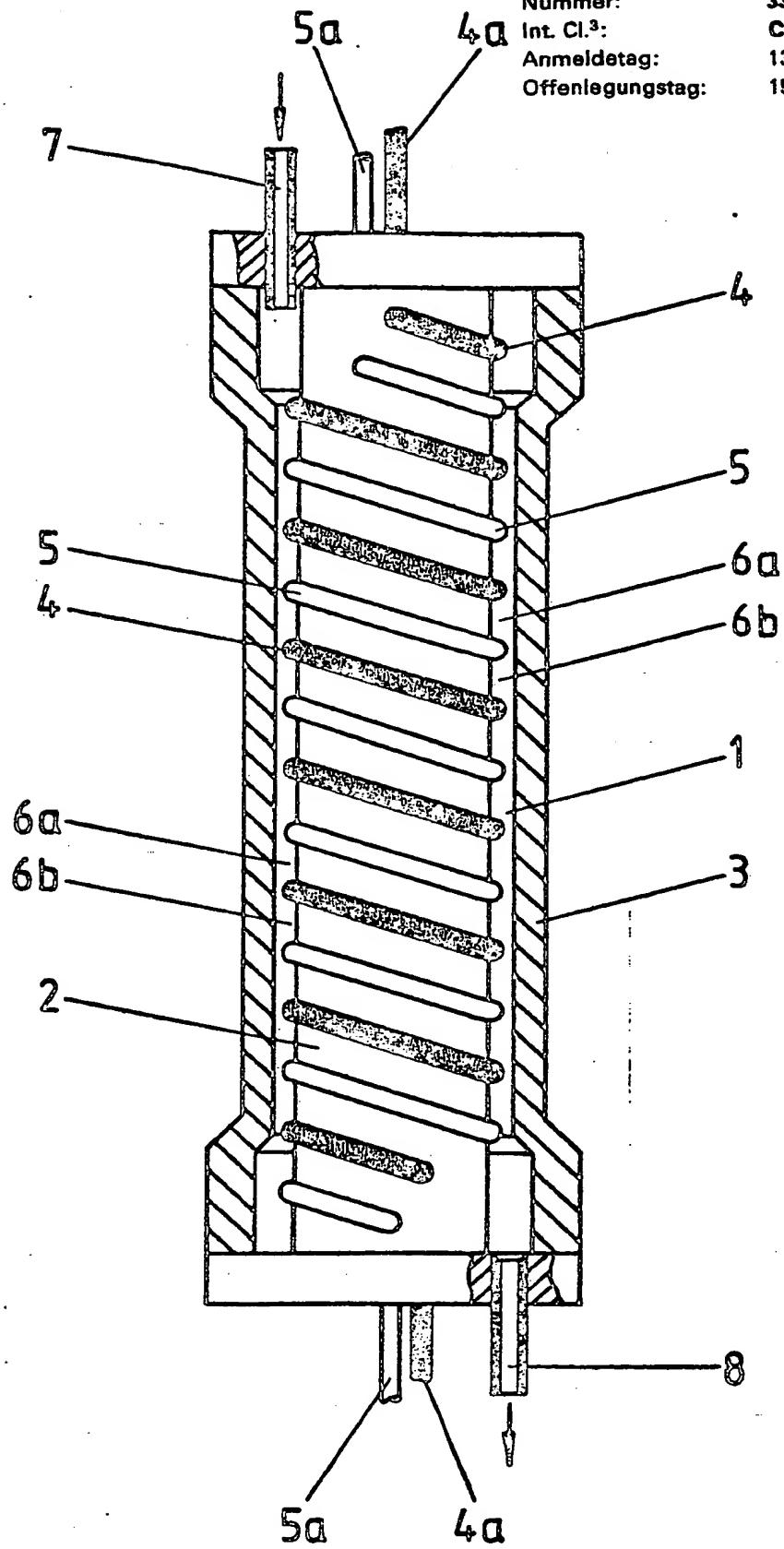


Fig. 1

-24-  
- Leerseite -

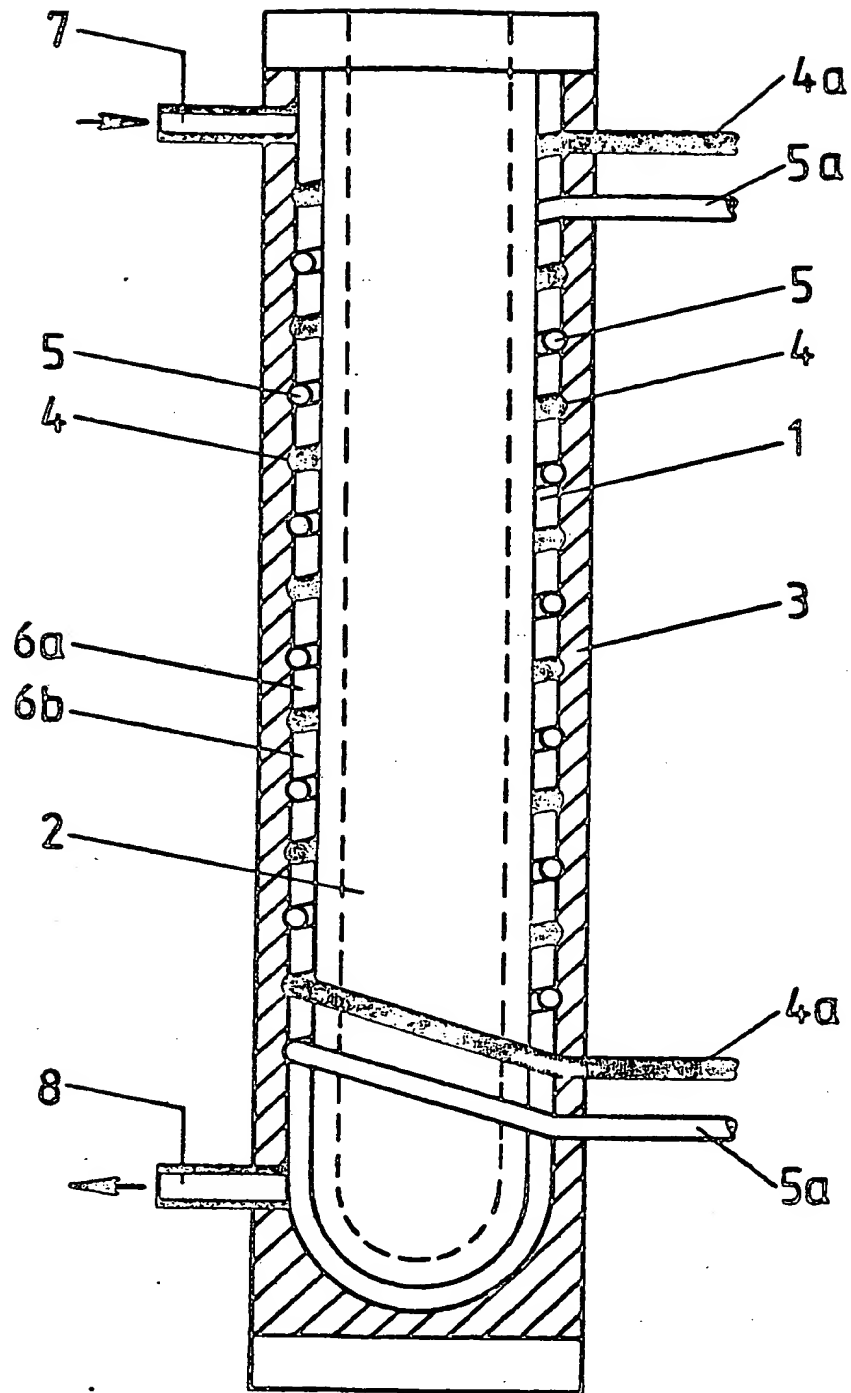


Fig. 2

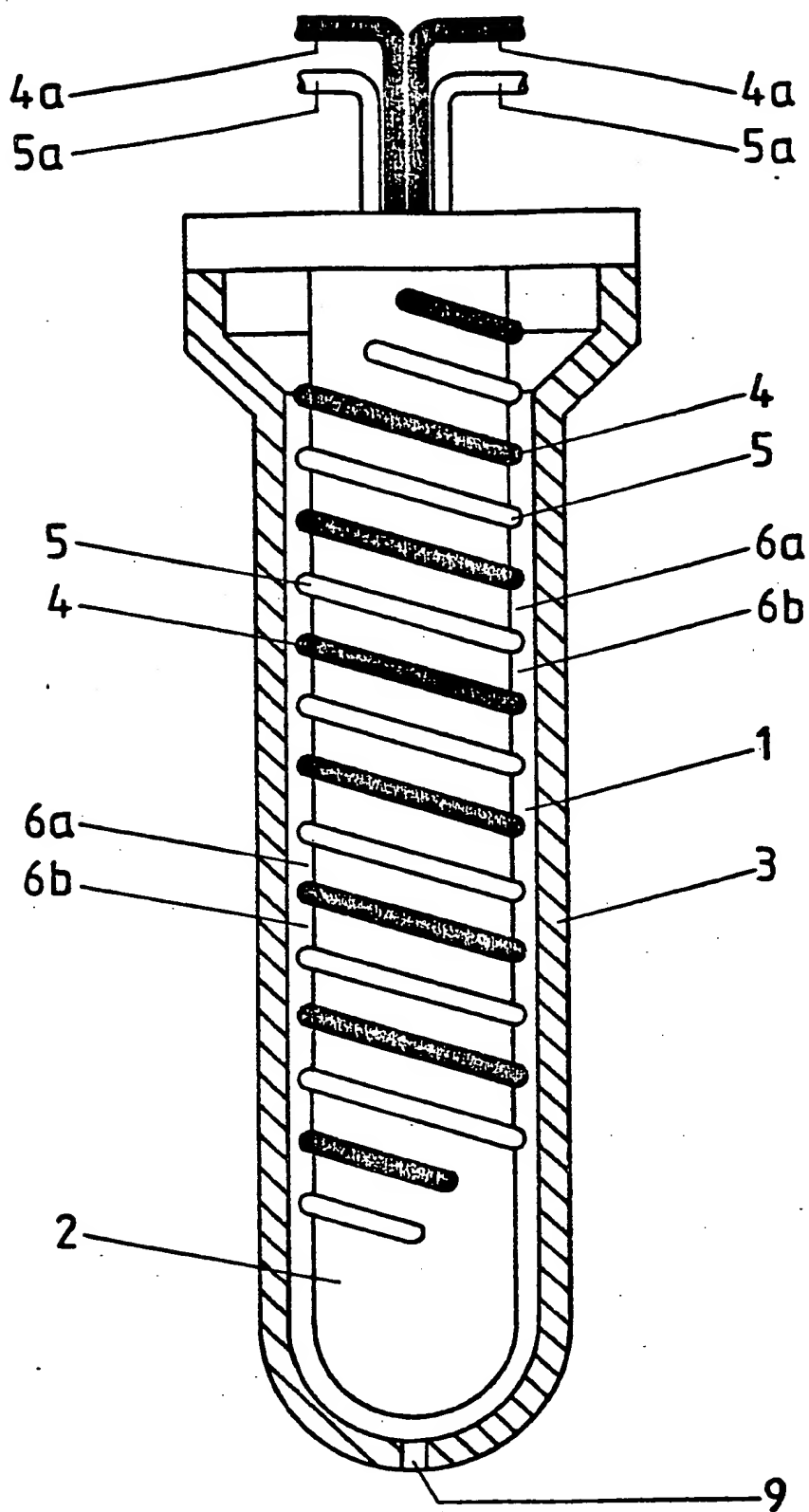


Fig. 3

13 3317415

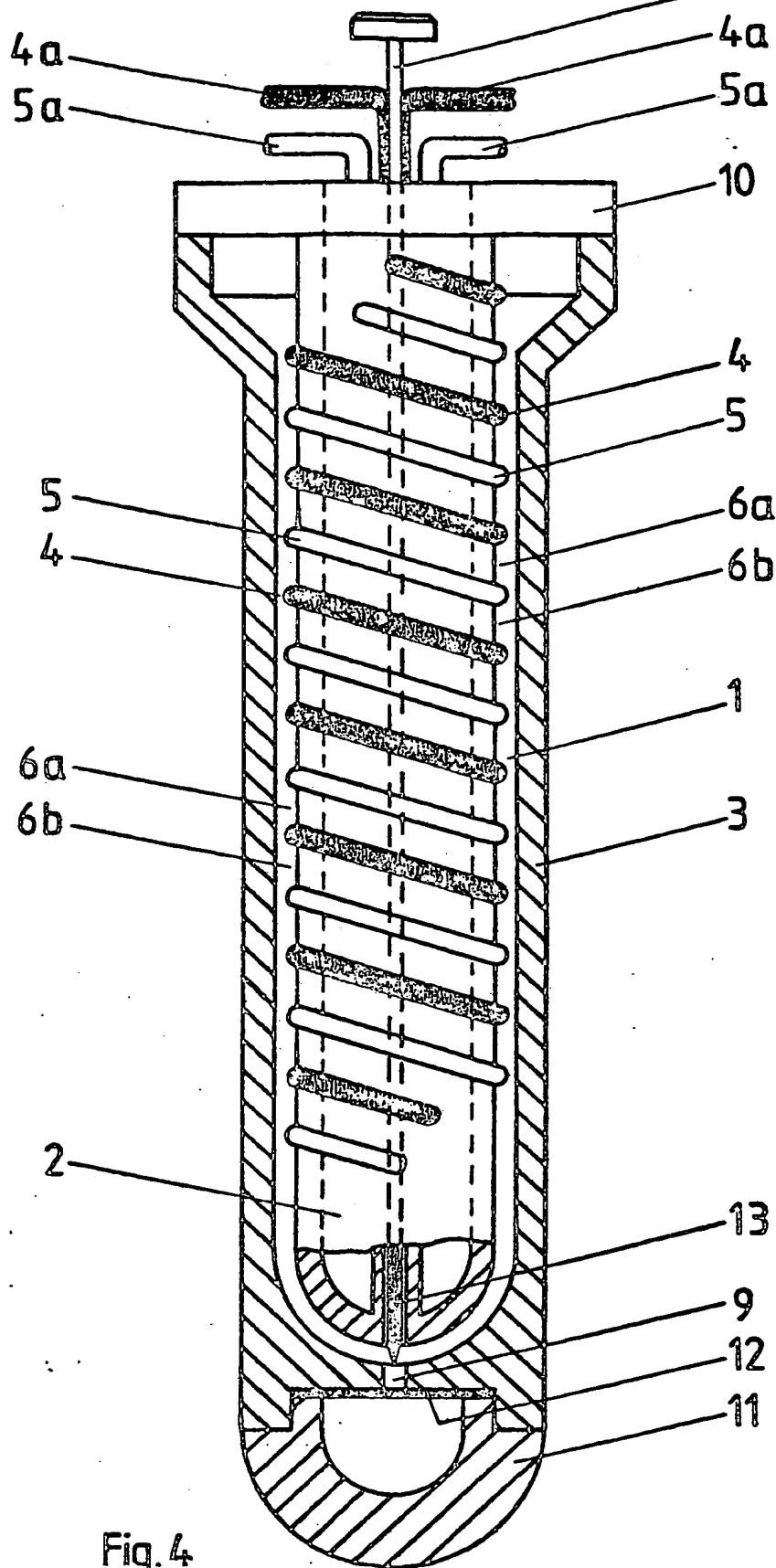


Fig. 4

29.07.83

3317415

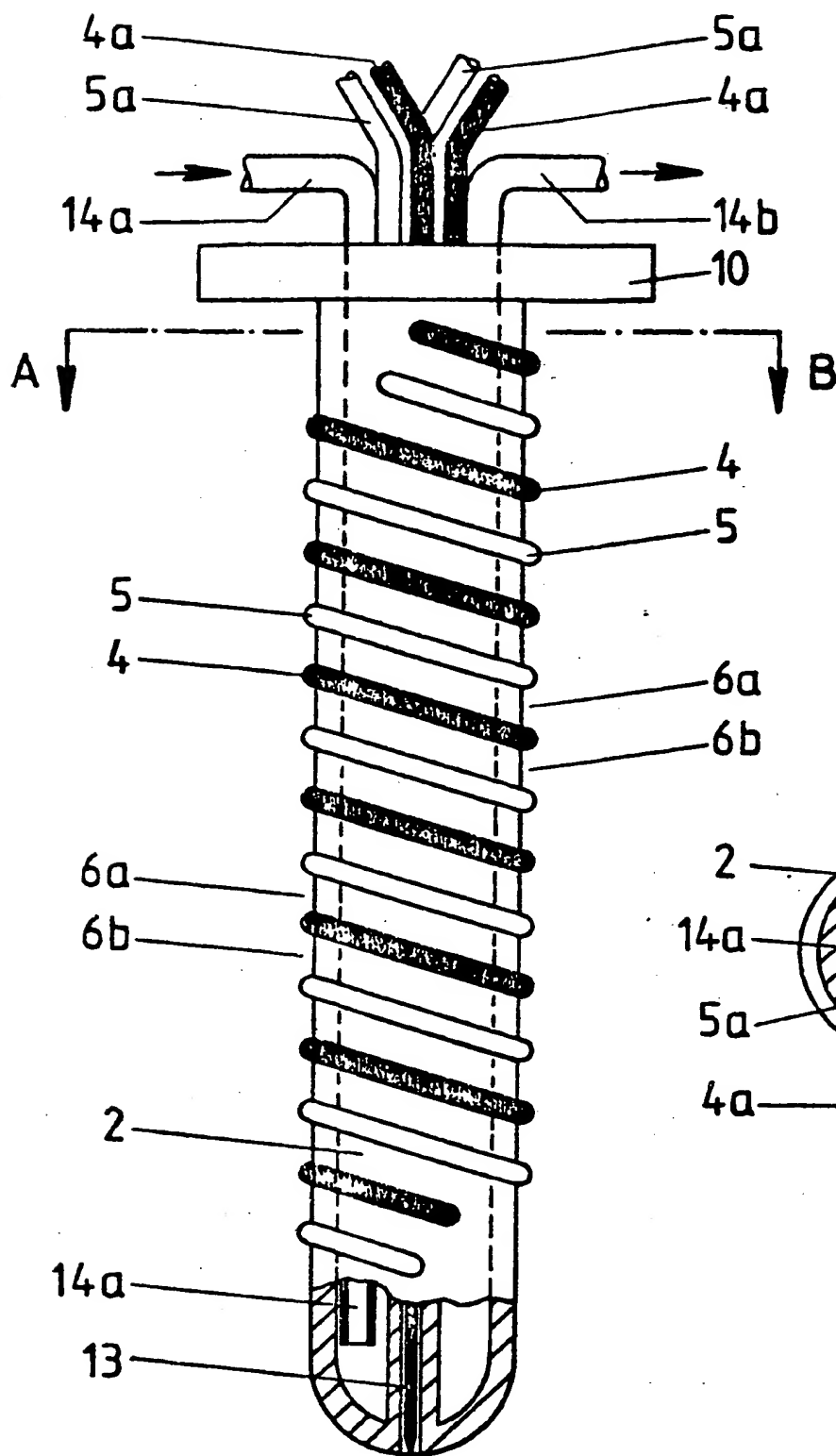


Fig. 5

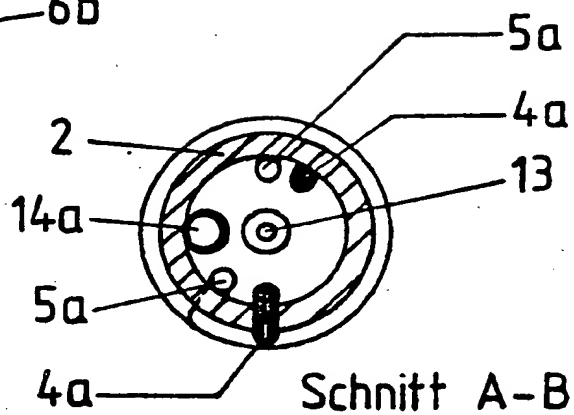


Fig. 6